PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : A61K 31/425 — A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/40832

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. November 1997 (06.11.97)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/00820

(22) Internationales Anmeldedatum: 24. April 1997 (24.04.97)

(30) Prioritätsdaten:
196 16 486.9 25. April 1996 (25.04.96) DE

(71) Anmelder *(für alle Bestimmungsstaaten ausser US)*: HANS-KNÖLL-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG E.V. [DE/DE]; Beutenbergstrasse 11, D-07745 Jena (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder *(nur für US)*: DEMUTH, Hans-Ulrich [DE/DE]; Hegelstrasse 14, D-06114 Halle (DE). ROSCHE, Fred [DE/DE]; Benndorfer Strasse 18a, D-06184 Dieskau (DE). SCHMIDT, Jörn [DE/DE]; Eichendorffstrasse 2, D-06114 Halle (DE). PAULY, Robert, P. [CA/CA]; 2631 Fairview Crescent, Vancouver, British Columbia V6T 2B8 (CA). MCINTOSH, Christopher, H., S. [CA/CA]; 605-2233 Allison Road, Vancouver, British Columbia V6T 1T7 (CA). PEDERSON, Ray, A. [CA/CA]; 3876 West 23rd Avenue, Vancouver, British Columbia V6S 1K9 (CA).

(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, JP, KR, MX, NZ, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht
Mit internationalem Recherchenbericht.
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: USE OF DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV INHIBITORS FOR LOWERING THE BLOOD GLUCOSE LEVEL IN MAMMALS

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSESPIEGELS IN SÄUGERN

(57) Abstract

The invention relates to the use of a method in which by reducing in the blood of a mammal by administration of effectors the enzyme activity of dipeptidyl peptidase (DP IV) or enzyme activity similar to DP IV, the endogenous (or additionally exogenously administered) insulinotropic peptide gastric inhibitory polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) and glucagon-like peptide amide-1 7-36 ($GLP\text{-}1_{7-36}$) (or similarly $GLP\text{-}1_{7-37}$ or analogues thereof) are decomposed in a causal sequence to a reduced extent by DP IV enzymes or those similar to DP IV. Consequently, the fall in the concentration of said peptide hormones or the analogues thereof is reduced or retarded. The increased stability, achieved by the action of DP IV effectors, of the incretine or the analogues thereof which are available endogenously or exogenously and consequently provided in increased numbers for insulinotropic stimulation of the incretine receptors of the Langerhans cells in the pancreas, changes the power of endogenous insulin thereby stimulating the metabolism of carbohydrates in the treated organism. The blood sugar level therefore drops below the glucose concentration, characteristic of hyperglycaemia, in the serum of the treated organism. Metabolic anomalies such as glucosuria, hyperlipidemia, possible serious metabolic acidosis, *diabetes mellitus*, which result from higher concentrations of glucose in the blood over a longer period of time, are prevented or alleviated. The method according to the invention is a novel way of lowering high blood glucose concentrations. It is simple, commercially applicable and suitable for use in human medicine for treating, in particular diseases caused by above-average blood glucose levels.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung beinhaltet die Anwendung eines Verfahrens, bei dem durch die Reduktion von Dipeptidyl Peptidase (DP IV-) bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität im Blut eines Säugers durch Verabreichung von Effektoren, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 ($GLP\text{-}1_{7-36}$) (o.a. $GLP\text{-}1_{7-37}$ oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird. In Folge dieser, durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielten, erhöhten Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert sich die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen, *Diabetes mellitus*, die die Folge längerer, erhöhter Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien
AM	Armenien
AT	Österreich
AU	Australien
AZ	Aserbaidschan
BA	Bosnien-Herzegowina
BB	Barbados
BE	Belgien
BF	Burkina Faso
BG	Bulgarien
BJ	Benin
BR	Brasilien
BY	Belarus
CA	Kanada
CF	Zentralafrikanische Republik
CG	Kongo
CH	Schweiz
CI	Côte d'Ivoire
CM	Kamerun
CN	China
CU	Kuba
CZ	Tschechische Republik
DE	Deutschland
DK	Dänemark
EE	Estland
ES	Spanien
FI	Finnland
FR	Frankreich
GA	Gabun
GB	Vereinigtes Königreich
GE	Georgien
GH	Ghana
GN	Guinea
GR	Griechenland
HU	Ungarn
IE	Irland
IL	Israel
IS	Island
IT	Italien
JP	Japan
KE	Kenia
KG	Kirgisistan
KP	Demokratische Volksrepublik Korea
KR	Republik Korea
KZ	Kasachstan
LC	St. Lucia
LI	Liechtenstein
LK	Sri Lanka
LR	Liberia
LS	Lesotho
LT	Litauen
LU	Luxemburg
LV	Lettland
MC	Monaco
MD	Republik Moldau
MG	Madagaskar
MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien
ML	Mali
MN	Mongolei
MR	Mauretanien
MW	Malawi
MX	Mexiko
NE	Niger
NL	Niederlande
NO	Norwegen
NZ	Neuseeland
PL	Polen
PT	Portugal
RO	Rumänien
RU	Russische Föderation
SD	Sudan
SE	Schweden
SG	Singapur
SI	Slowenien
SK	Slowakei
SN	Senegal
SZ	Swasiland
TD	Tschad
TG	Togo
TJ	Tadschikistan
TM	Turkmenistan
TR	Türkei
TT	Trinidad und Tobago
UA	Ukraine
UG	Uganda
US	Vereinigte Staaten von Amerika
UZ	Usbekistan
VN	Vietnam
YU	Jugoslawien
ZW	Zimbabwe

VERWENDUNG VON DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV HEMMER ZUR SENKUNG DES BLUTGLUKOSE-SPIEGELS IN SÄUGERN

Die Erfindung betrifft ein einfaches Verfahren zur Senkung der Blutzuckerkonzentration mit Hilfe von aktivitätsmindernden *Effektoren* (Substraten, Pseudosubstraten, Inhibitoren, Bindungsproteinen, Antikörpern u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

Neben Proteasen, die in unspezifische Proteolyse einbezogen sind, was letztlich den Abbau von Proteinen zu Aminosäuren bewirkt, kennt man regulatorische Proteasen, die an der Funktionalisierung (Aktivierung, Deaktivierung, Modulierung) von endogenen Peptidwirkstoffen beteiligt sind [KIRSCHKE, H., LANGNER, J., RIEMANN, S., WIEDERANDERS, B., ANSORGE, S. and BOHLEY, P., Lysosomal cysteine proteases. *Excerpta Medica* (Ciba Foundation Symposium 75), 15 (1980); KRÄUSSLICH, H.-G. and WIMMER, E., Viral Proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 701 (1987)]. Insbesondere im Zusammenhang mit der Immunforschung und der Neuropeptidforschung sind eine Reihe solcher sogenannten Konvertasen, Signalpeptidasen oder Enkephalinasen entdeckt worden [GOMEZ, S., GLUSCHANKOF, P., LEPAGE, A., MARRAKCHI, N. and COHEN, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5468 (1988); ANSORGE, S. and SCHÖN, E., *Histochem.* 82, 41 (1987)].

Aufgrund der Häufigkeit des Vorkommens der Aminosäure Prolin in einer Vielzahl von Peptidhormonen und den damit verbundenen Struktureigenschaften dieser Peptide wird für prolinspezifische Peptidasen eine den Signalpeptidasen analoge Funktion diskutiert [YARON, A., The Role of Proline in the Proteolytic Regulation of Biologically Active Peptides. *Biopolymers* 26, 215 (1987); WALTER, R., SIMMONS, W.H. and YOSHIMOTO, T., Proline Specific Endo- and Exopeptidases. *Mol. Cell. Biochem.* 30, 111 (1980); VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing. *FASEB Journal* 9, 736 (1995)]. Dabei bestimmt Prolin in diesen Peptiden durch seine besondere Struktur sowohl Konformation als auch Stabilität dieser Peptide, indem sie vor Abbau durch unspezifische Proteasen schützt [KESSLER, H., Konformation und biologische Wirkung von zyklischen Peptiden. *Angew. Chem.* 94, 509 (1982)]. Enzyme, die dagegen hochspezifisch strukturverändernd auf Prolin-haltige Sequenzen einwirken (HIV-Protease, Cyclophylin u. a.) sind attraktive Ziele der aktuellen Wirkstoff-Forschung. Insbesondere für die nach dem Prolin spaltenden Peptidasen Prolyl Endopeptidase (PEP) und

Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV) konnten Beziehungen zwischen der Modulation der biologischen Aktivität von natürlichen Peptidsubstraten und deren selektiver Spaltung durch diese Enzyme wahrscheinlich gemacht werden. So nimmt man an, daß PEP eine Rolle beim Lernen bzw. im Gedächtnisprozeß spielt und DP IV in die Signalübertragung während der Immunantwort einbezogen ist [ISHIURA, S., TSUKAHARA, T., TABIRA, T., SHIMIZU, T., ARAHATA K. and SUGITA, H., *FEBS-Letters* 260, 131 (1990); HEGEN, M., NIEDOBITEK, G., KLEIN, C.E., STEIN, H. and FLEISCHER, B., *J. of Immunology* 144, 2908 (1990)].

Ähnlich wie die außerordentliche Prolinspezifität dieser Enzyme wird ihre hohe Selektivität für die Aminosäure Alanin innerhalb typischer Erkennungsregionen in Substraten dieser Enzyme diskutiert, wonach Alanin-haltige Peptide ähnliche Konformationen einnehmen können wie strukturanaloge Prolin-haltige Peptide. Kürzlich wurden derartige Eigenschaften Alanin-haltiger Peptidketten durch Punktmutation (Austausch von Prolin gegen Alanin) nachgewiesen [DODGE, R.W. and SCHERAGA, H.A., Folding and unfolding kinetics of the proline-to-alanine mutants of bovine pancreatic ribonuclease A. *Biochemistry* 35 (5) 1548 (1996)].

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen. Deshalb wird davon ausgegangen, daß dieses Enzym an der Regulation von Polypeptiden *in vivo* beteiligt ist [VANHOOF, G., GOOSSENS, F., DE MEESTER, I., HENDRIKS, D. and SCHARPÉ, S., Proline motifs and their biological processing, *FASEB Journal* 9, 736 (1995)].

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 ($GLP\text{-}1_{7-36}$), Hormone, die die Glukose-induzierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch *Incretine*), sind Substrate der DP IV, da sie von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in situ* abspalten kann [MENTLEIN, R., GALLWITZ, B., and SCHMIDT, W.E., Dipeptidyl Peptidase IV hydrolyzes gastric inhibitory polypeptide, glucagon-like peptide-1(7-36)amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* 214, 829 (1993)].

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher

Substrate *in vivo* kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen als auch in pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249-278 (1990); DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Z. B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u. a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind [BROWN, J.C., DAHL, M., KWAWK, S., MCINTOSH, C.H.S., OTTE, S.C. and PEDERSON, R.A. *Peptides* 2, 241 (1981); SCHMIDT, W.E., SIEGEL, E.G., GALLWITZ, B. KUMMEL, H., EBERT, R. and CREUTZFELDT, W., Characterization of the inulinotropic activity of fragments derived from gastric inhibitory polypeptide. *Diabetologia* 29, 591A (1986); ADELHORST, K., HEDEGAARD, B.B., KNUDSEN, L.B. and KIRK, O., Structure-activity studies of glucagon-like peptide. *J. Biol. Chem.* 296, 6275 (1994)].

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, als auch die moderneren Verfahren zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche *i.v.*. Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen [LACY, P., Status of Islet Cell Transplantation. *Diabetes Care* 16 (3) 76 (1993)].

Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injektionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung

des Immunsystems [LACY, P., Treating Diabetes with Transplanted Cells. *Sci. Americ.* 273 (1) 40-46 (1995)].

Die möglichst orale Applikation hochaffiner, niedermolekularer Enzyminhibitoren dagegen ist eine kostengünstigere Alternative z. B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Derartige Enzyminhibitoren finden inzwischen therapeutischen Einsatz als Immunsuppressiva, Antithrombotika und als AIDS-Virostatika. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearence-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden [SANDLER, M. and SMITH, H.J., Hrsg., *Design of Enzyme Inhibitors as Drugs*. Oxford University Press, Oxford (1989); MUNROE, J.E., SHEPHERD, T.A., JUNGHEIM, L.N., HORNBACK, W.J., HATCH, S.D., MUESING, M.A., WISKERCHEN, M.A., SU, K.S., CAMPANALE, K.M., BAXTER, A.J., and COLACINO, J.M., Potent, orally bioavailable HIV-1 protease inhibitors containing noncoded D-amino acids. *Bioorg. Medicinal Chem. Letters* 5 (23) 2897 (1995)].

Das Ziel der Erfindung ist ein einfaches und neuartiges Verfahren zur Senkung des Blutglukosespiegels, das erfindungsgemäß dadurch erreicht werden kann, daß mittels Verabreichung von Effektoren an einen Säugerorganismus, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP_{1-42} und $GLP\text{-}1_{7-36}$ (o.a. $GLP\text{-}1_{7-37}$ oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Pepdidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert wird.

Der Erfindung liegt der überraschende Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität kausal zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulierten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) zur Folge hat, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-anloger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann.

2. erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat.

3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in nachfolgender Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Die Erfindung betrifft somit die Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase VI (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität. Zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säugern der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidaemie, metabolischer Azidosen und Diabetes Mellitus. In einer weiteren bevorzugten Ausfuehrungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man einem Säuger-Organismus eine therapeutisch wirksame Menge eines Effektos der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität verabreicht.

In einer zweiten bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-Analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Erfindungsgemäße Effektoren sind z.B. DP IV-Inhibitoren wie die Dipeptidderivate bzw. Dipeptidmimetika Alanyl-Pyrolidid, Isoleucyl-Thiazolidid sowie das Pseudosubstrat N-Valyl-Prolyl, O-Benzoyl Hydroxylamin. Derartige Verbindungen sind aus der Literatur bekannt [DEMUTH, H.-U., Recent developments in the irreversible inhibition of serine and cysteine proteases. *J. Enzyme Inhibition* 3, 249 (1990)] oder in Analogie zu den in der Literatur be-

schriebenen Methoden herstellbar.

Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Es ist einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden in Form von pharmazeutischen Präparaten enthaltend den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien verabreicht. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. *i.v.*, in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z. B. kann im Falle von Aminoacyl-Thiazolididen ein solcher Dosisbereich zwischen 1.0 mg und 10.0 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm liegen.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Inhibierung der DP IV-katalysierten Hydrolyse der Incretine GIP_{1-42} und $GLP\text{-}1_{7-36}$ in situ

Sowohl *in vitro* mit gereinigtem Enyzm als auch *in situ*, z.B. in gepooltem humanem Serum, kann man die Hydrolyse der Incretine, verursacht durch DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität, nachweisen bzw. mit Hilfe von Inhibitoren unterdrücken (Abb. 1).

Erfindungsgemäß erreicht man *in situ* bei Inkubation von 30 µM GIP_{1-42} bzw. 30 µM $GLP\text{-}1_{7-36}$ und 20 µM Isoleucyl-Thiazolidid (1a), einem reversiblen DP IV-Inhibitor in 20 %-igem Serum bei pH 7.6 und 30 °C die komplette Unterdrückung der Enzym-katalysierten Hydrolyse beider Peptid-hormone innerhalb von 24 Stunden (1b und 1c, jeweils obere Spektren. Synthetisches GIP_{1-42} (5 µM) und synthetisches $GLP\text{-}1_{7-36}$ (15 µM) wurden mit humanem Serum (20 %) in 0.1 mM TRICINE Puffer bei pH 7.6 und 30 °C für 24 Stunden inkubiert. Proben der Inkubationsansätze (für GIP_{1-42} 2.5 pmol und im Falle von $GLP\text{-}1_{7-36}$ 7.5 pmol) wurden nach verschiedenen Zeiten entnommen. Die Proben wurden mit 2',6'-Dihydroxyacetophenon als Matrix co-kristallisiert und mittels MALDI-TOF-Massen-spektrometrie analysiert. Die Spektren (Abb. 1) stellen Akkumulationen von 250 einzelnen Laserschüssen pro Probe dar.

(1b) Die Signale im Bereich von *m/z* 4980.1 ± 5.3 entsprechen GIP_{1-42} (*M* 4975.6) und *m/z* 4745.2 ±5.5 dem DP IV-Hydrolyseprodukt GIP_{3-42} (*M* 4740.4).

(1c) Die Signale *m/z* 3325.0 ± 1.2 entsprechen $GLP\text{-}1_{7-36}$ (*M* 3297.7) und *m/z* 3116.7 ± 1.3 dem DP IV-Hydrolyseprodukt $GLP\text{-}1_{9-36}$ (*M* 3089.6).

In den Versuchsansätzen ohne Inhibitor wurden die Incretine in dieser Zeit fast vollständig abgebaut (Abb. 1b und 1c, jeweils untere Spektren).

Beispiel 2: Inhibierung des Abbaus von GLP-1$_{7-36}$ durch den DP IV-Inhibitor Isoleucyl-Thiazolidid in vivo.

Verfolgt man den Metabolismus der nativen Incretine (hier GLP-1$_{7-36}$) im Serum der Ratte in Abhängigkeit in Gegenwart des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid (*i.v.* Injektion einer 1.5 µM Inhibitorlösung in 0.9 %-iger Kochsalzlösung) gegenüber einer Kontrolle, so ist bei einer Konzentration des Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid von ca. 0.1 mg/kg Laborratte bei den Inhibitor-behandelten Versuchstieren (n = 5) im Verlaufe des Versuchszeitraums kein Abbau des insulino-tropen Peptidhormons GLP-1$_{7-36}$ zu beobachten (Abb. 2).

Zur Detektion der Metaboliten in Anwesenheit und Abwesenheit des DP IV-Inhibitors (20 Minuten nach vorheriger *i.v.*-Inhibitor- bzw. Kochsalzgabe) erhielten die Versuchs- und Kontrolltiere *i.v.* 50 - 100 pM ^{125}I-GLP-1$_{7-36}$ (spezifische Aktivität ca. 1 µMCi/pM). Blutproben wurden nach 2 - 5 min entnommen und das Plasma mittels 20 % Acetonitril extrahiert. Nachfolgend wurde der Peptidextrakt mittels RP-HPLC separiert und die Radioaktivität der Fraktionen an einem γ-Counter analysiert. Die gefundene Aktivität ist in cpm (*counts per minute* relativ zum Maximum angegeben).

Beispiel 3: Modulation der Insulinwirkung und Senkung des Blutglukosespiegels nach i.v. Applikation des DP IV-Inhibitors Isoleuzyl-Thiazolidid in vivo.

An der durch intraduodenale (*i.d.*) Injektion Glukose-stimulierten Ratte, kann durch *i.v.* Gabe verschiedener DP IV-Effektoren, z. B. von 0.1 mg Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte eine auf die Inhibitorwirkung zurückgehende, zeitlich verzögert einsetzende Senkung des Glukosespiegels beobachtet werden. Dieser Effekt ist dosisabhängig und nach Absetzen der Infusion von 0.05 mg/min des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid pro kg Ratte reversibel. Die *i.v.* Applikation der gleichen Glukosemenge von Inhibitor-behandelten und Kontroll-Tieren zeigt im Gegensatz zur den *i.d.* Glukose-stimulierten Versuchstieren keine vergleichbare Wirkung.

Abbildung 3 verdeutlicht diese Zusammenhänge an den Inhibitor-abhängigen Veränderungen der Plasmaparameter: A - DP IV-Aktivität, B - Plasma-Insulinspiegel, C - Blutglukosespiegel.

Die Versuchstiere (n = 5, männliche Wistar-Ratten, 200-225 g) erhielten als Initialdosis 1.5 µM Isoleucyl-Thiazolidid in 0.9 %-iger Kochsalzlösung (▲) oder gleiche Volumina 0.9%-ige Kochsalzlösung ohne Inhibitor (■) (Kontrollgruppe n = 5). Die Versuchsgruppe erhielt weiterhin eine Infusion des Inhibitors von 0.75 µM/min über 30 min Versuchszeit (*). Der Kontrollgruppe wurde im gleichen Zeitraum eine Inhibitor-freie 0.9%-ige Kochsalzlösung infundiert. Zum Zeitpunkt t=0 erhielten die Tiere *i.d.* eine Glukosedosis von 1g/kg 40%-iger Dextroselösung (w/v).

Allen Versuchstieren wurden Blutproben in zehn Minutenabständen entnommen.

Glukose Messungen erfolgten am Vollblut (Lifescan One Touch II analyzer) während die DP IV-Aktivität und die Insulinkonzentrationen im Plasma bestimmt wurden.

Der hier angewandte Insulintest ist empfindlich zwischen 10 und 160 mU/ml [PEDERSON, R.A., BUCHAN, A.M.J., ZAHEDI-ASH, S., CHEN, C.B. & BROWN, J.C. *Reg. Peptides.* 3, 53-63 (1982)]. Die DP IV-Aktivität wurde spektralphotometrisch bestimmt [DEMUTH, H.-U. and HEINS, J., On the catalytic Mechanism of Dipeptidyl Peptidase IV. in *Dipeptidyl Peptidase IV (CD 26) in Metabolism and the Immune Response* (B. Fleischer, Ed.) R.G. Landes, Biomedical Publishers, Georgetown, 1-35 (1995)]. Alle Meßwerte sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Patentansprüche

1. Verwendung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verabreichung von Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität an Säuger der Verhinderung oder Milderung pathologischer Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen ausgewählt aus Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischer Azidosen und *Diabetes mellitus* dient.

3. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Effektoren der Dipeptidyl Peptidase (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen der genannten Effektoren verwendet werden.

4. Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität zur Anwendung in einem Verfahren zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus.

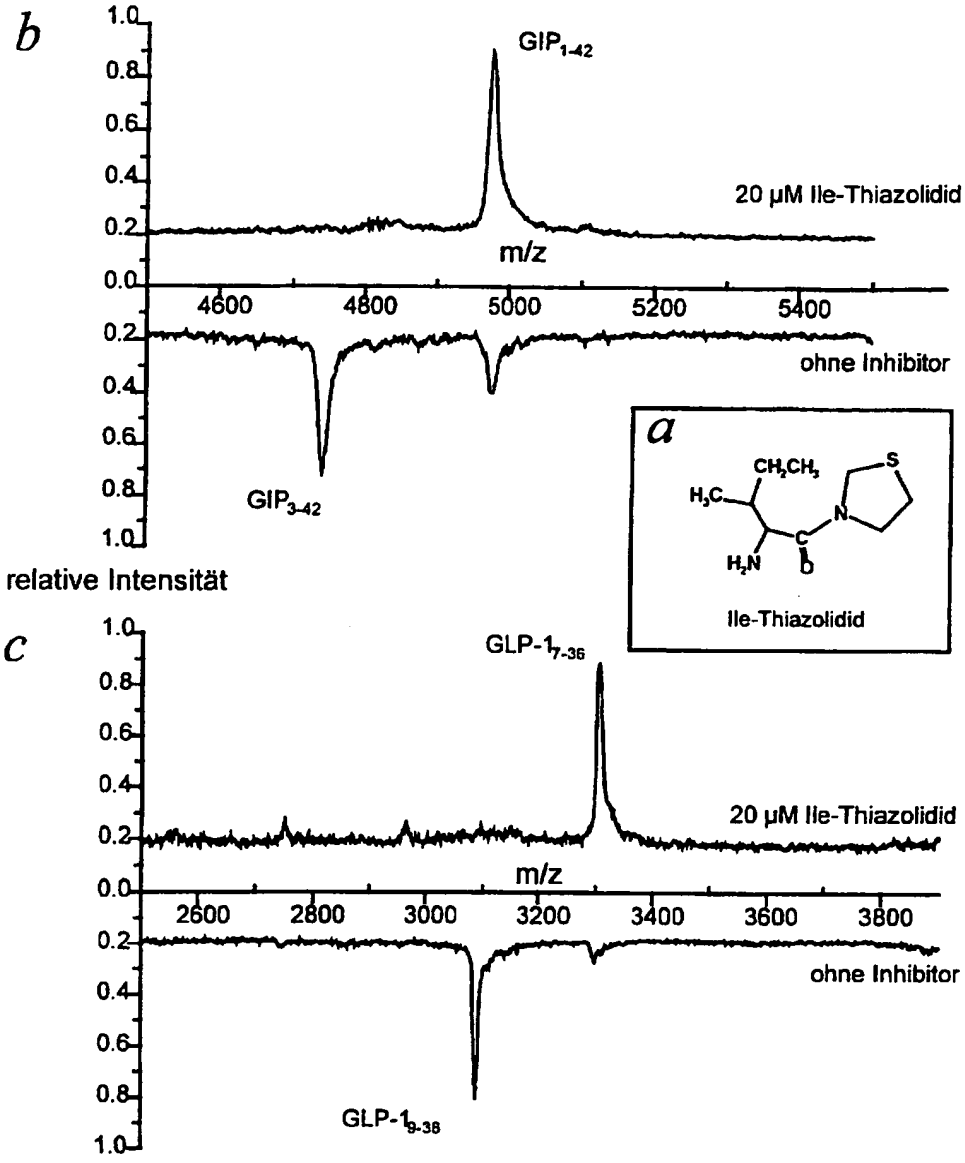


Abb. 1: MALDI-TOF-Analyse der DP IV-katalysierten Hydrolyse von GIP_{1-42} (b) und $GLP\text{-}_{7-36}$ und deren Hemmung durch Isoleucyl-Thiazolidid (a).

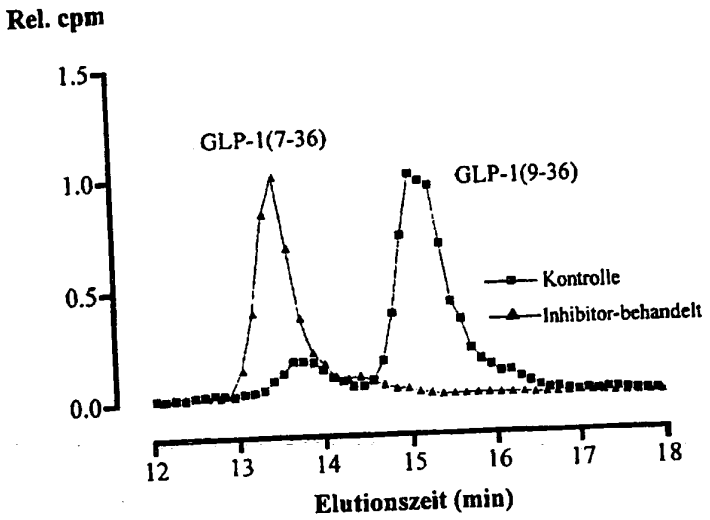


Abb. 2: HPLC-Analyse der Serumpräsenz von GLP-1 Metaboliten in Gegenwart und in Abwesenheit DP IV Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid *in vivo*.

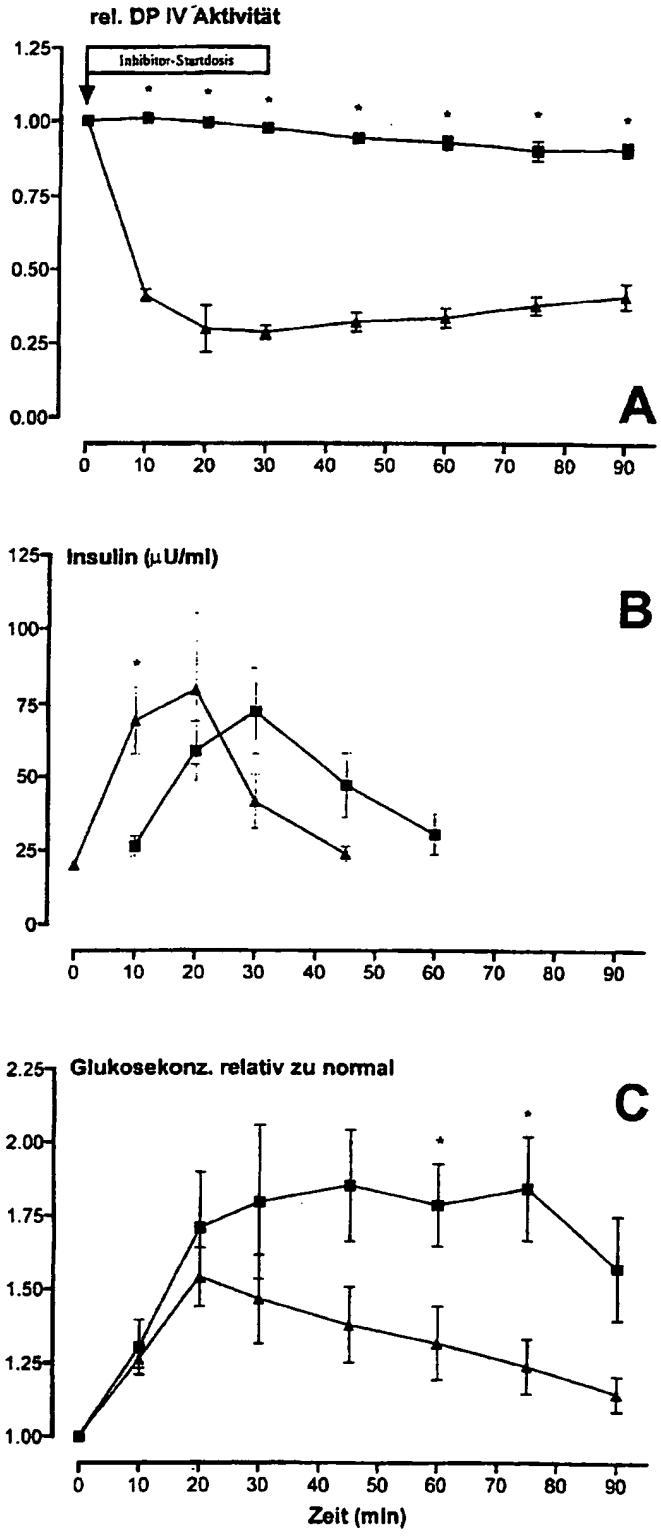


Abb. 3: Einfluß des DP IV-Inhibitors Isoleucyl-Thiazolidid auf verschiedene Blutparameter der *i.d.*-Glukose-stimulierten Ratte.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No
PCT/DE 97/00820

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 A61K31/425

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	H.-U. DEMUTH: "Recent developments in inhibiting cysteine and serine protease." J. ENZYME INHIB., vol. 3, no. 4, 1990, pages 249-278, XP002041620 cited in the application ---	
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, vol. 136, no. 8, 1995, pages 3585-3597, XP002041621 --- -/--	

[X] Further documents are listed in the continuation of box C.

[X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
24 September 1997	13.10.97

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016	Klaver, T

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. al Application No
PCT/DE 97/00820

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21 November 1991 see abstract ---	
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24 August 1995 -----	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. al Application No
PCT/DE 97/00820

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A	29-08-95
		AU 681251 B	21-08-97
		AU 1718195 A	04-09-95
		EP 0754454 A	22-01-97

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. ales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 A61K31/425

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	H.-U. DEMUTH: "Recent developments in inhibiting cysteine and serine protease." J. ENZYME INHIB., Bd. 3, Nr. 4, 1990, Seiten 249-278, XP002041620 in der Anmeldung erwähnt ---	
A	T.J. KIEFFER ET AL.: "degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV." ENDOCRINOLOGY, Bd. 136, Nr. 8, 1995, Seiten 3585-3597, XP002041621 --- -/--	

[X] Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

[X] Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
24.September 1997	13. 10. 97

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde	Bevollmächtigter Bediensteter
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Klaver, T

Formblatt PCT/ISA/210 (Blatt 2) (Juli 1992)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern ales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DATABASE WPI Week 9217 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 92-132891 XP002041622 & DD 296 075 A (LUTHER UNIVERSITÄT HALLE) , 21.November 1991 siehe Zusammenfassung ---	
A	WO 95 22326 A (ZERIA PHARMACEUTICAL CO.) 24.August 1995 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inten nales Aktenzeichen
PCT/DE 97/00820

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9522326 A	24-08-95	JP 7228529 A	29-08-95
		AU 681251 B	21-08-97
		AU 1718195 A	04-09-95
		EP 0754454 A	22-01-97

THIS PAGE BLANK (USPTO)